

[TRANSLATION]

KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Industrial Property Office.

Application Number : 10-2000-43675

Date of Application : July 28, 2000

Applicant(s) : Samsung Electronics Co. Ltd.

June 11, 2001

COMMISSIONER (seal)

【Document】 Patent Specification

【Receiver】 Commissioner of Korean Industrial Property Office

【Filing Date】 2000. 07. 28

【Title of the Invention】 Novel Microorganism Isolated from Chinese elm(Ulmus sp.) and Process for Preparing Immunostimulating Exopolysaccharides with Anti-cancer Activity by Employing the Microorganism

【Applicant(s)】

Name : Samsung Electronics Co. Ltd.
I.D. No. : 1-1998-104271-3

【Agent(s)】

Name : Han-Young Lee
I.D. No. : 9-1998-000375-1
No. of General Power Registration: 1999-022354-9

【Inventor(s)】

Name : YANG, Young Lyeol
Nationality : Republic of Korea
Address : 101-1407 Sejong Apartment Jeunmin-dong,
Yusung-gu, Taejon, Republic of Korea

Name : KIM, Young Joo
Nationality : Republic of Korea
Address : 102-1206 Sejong Apartment Jeunmin-dong,
Yusung-gu Taejon, Republic of Korea

【Deposit】

Name of Institution : Korean Collection for Type
Cultures (KCTC) at Korea Research
Institute of Bioscience and
Biotechnology(KRIBB)

Accession Number : ECTC 0687BP

Date of Deposit : Nov. 03, 2000

【Purport】 This application is filed pursuant to Art. 42, while submitting the request for examination pursuant to Art.60.

Agent: Han-Yeung Lee (seal)

【Request for Examination】 Filed

【Attachment(s)】
1. Abstract, Specification(Drawing(s))
2. Declaration with a Copy of Certificate for
Microorganism Deposition
[Copy, Translation]

11046 U.S. PTO
09/921013
07/27/01

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2000년 제 43675 호
Application Number

출원년월일 : 2000년 07월 28일
Date of Application

출원인 : 삼성전자 주식회사
Applicant(s)

2001 년 06 월 11 일

특 허 청 장

COMMISSIONER

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.07.28
【발명의 명칭】	느릅나무로부터 분리된 신규의 미생물 및 그를 이용한 항암 면역활성의 세포벽 당화합물의 제조방법
【발명의 영문명칭】	Novel Microorganism Isolated from Chinese elm(Ulmussp. and Process for Preparing Immunostimulating Exopolysaccharides with Anti-cancer Activity by Employing the Microorganism
【출원인】	
【명칭】	삼성전자 주식회사
【출원인코드】	1-1998-104271-3
【대리인】	
【성명】	이한영
【대리인코드】	9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】	1999-022354-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	양영렬
【성명의 영문표기】	YANG, Young Lyeol
【주민등록번호】	671226-1664016
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 세종 아파트 101동 1407호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김영주
【성명의 영문표기】	KIM, Young Joo
【주민등록번호】	601212-1551719
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 세종 아파트 102동 1206호
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】

생명공학연구소 유전자은행(KCTC)

【수탁번호】

KTCT 0687BP

【수탁일자】

1999. 11. 03

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이한영 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20 면 29,000 원

【가산출원료】

19 면 19,000 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

14 항 557,000 원

【합계】

605,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통[사,
역문]

【요약서】

【요약】

본 발명은 살아있는 느릅나무 뿌리껍질로부터 분리된 항암 면역활성의 세포막 당화합물을 생산하는 신규 미생물(*Enterobacter* sp.), 그 균주를 발효배지에서 배양하여 세포막 당화합물을 제조하는 방법, 이렇게 생산된 세포막 당화합물 및 그 당화합물의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 세포막 당화합물은 분자량 100,000 ~ 1,000,000로서, 40 내지 75%의 총 당(10~30%의 글루코스(glucose), 1% 이하의 프룩토스(fructose), 10~15%의 갈락토스(galactose), 8~12%의 푸코스(fucose), 40~70%의 글루쿠론산(glucuronic acid)으로 구성됨), 5 내지 15%의 총 산성당, 10 내지 25%의 총 단백질로 구성되어 있다. 이러한 구성의 세포막 당화합물은 면역세포의 증식과 그 세포의 분열촉진 및 혼합림프액의 강한 면역증강활성을 나타내며, 나아가 생체내 면역활성에 의한 우수한 항암효과를 나타낸다. 또한, 본 발명의 세포막 당화합물은 미생물의 발효에 의해 생산되므로, 자연보호에도 일조할 뿐만 아니라 시간이나 공간에 제약을 받지 않고, 균일한 품질로서 대량으로 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명의 세포막 당화합물은 항암제, 면역증강제 또는 건강식품의 유효성분으로 사용될 수 있을 것이다.

【대표도】

도 7b

【색인어】

느릅나무, 세포막 당화합물(Exopolysaccharide), 항암 면역활성

【명세서】**【발명의 명칭】**

느릅나무로부터 분리된 신규의 미생물 및 그를 이용한 항암 면역활성의 세포막 당화합물의 제조방법{Novel Microorganism Isolated from Chinese elm(Ulmus sp.) and Process for Preparing Immunostimulating Exopolysaccharides with Anti-cancer Activity by Employing the Microorganism}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 살아있는 느릅나무 뿌리껍질로부터 세포막 당화합물을 생산하는 미생물의 분리과정을 나타내는 개략도이다.

도 2는 신규 미생물을 이용하여 발효에 의한 세포막 당화합물의 제조과정을 나타내는 개략도이다.

도 3은 세포막 당화합물을 생산하는 미생물의 회분식 발효시의 발효양상을 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 세포막 당화합물의 구성성분 및 각 성분의 함량을 나타내는 그래프이다.

도 5는 세포막 당화합물의 유변학적 성질을 잔탄검(Xanthan gum)과 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 6은 세포막 당화합물의 농도에 따른 면역세포의 증식정도를 나타내는 그래프이다.

도 7a는 본 발명의 세포밖 당화합물이 처리되지 않은 면역세포의 현미경 사진이다.

도 7b는 본 발명의 세포밖 당화합물이 처리된 면역세포의 증식을 나타내는 현미경 사진이다.

도 8은 본 발명의 세포밖 당화합물의 혼합림프액 반응정도를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 세포밖 당화합물에 의한 면역세포 분열의 촉진 정도를 나타내는 그래프이다.

도 10은 패혈성 쇼크 모델에서 본 발명의 세포밖 당화합물이 보여주는 독성 정도를 나타내는 그래프이다.

도 11a, 11b는 B16 흑색종 모델에서 본 발명의 세포밖 당화합물이 보여주는 생체내 항암효능을 그의 농도별로 나타낸 그래프이다.

도 12a, 12b는 생체내 항암효능 측정시 본 발명의 세포밖 당화합물의 농도에 따른 마우스의 체중 변화를 나타내는 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 느릅나무(Chinese elm,

Ulmus sp.)로부터 분리된 신규의 미생물 및 그를 이용한 항암 면역활성의 세포막 당화합물(exopolysaccharide)의 제조방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 살아 있는 느릅나무 뿌리껍질로부터 분리된 항암 면역활성의 세포막 당화합물을 생산하는 신규 미생물(*Enterobacter* sp.), 그 균주를 발효배지에서 배양하여 세포막 당화합물을 제조하는 방법, 이렇게 생산된 세포막 당화합물 및 그 당화합물의 용도에 관한 것이다.

<15> 종래로부터 당화합물(polysaccharide)은 식물이나 해조류등의 천연물 또는 미생물의 배양에 의해 생산되어 왔으며, 이는 식품이나 의약분야등에서 다양하게 이용되고 있다. 아울러, 당화합물이 갖는 다양한 용도로 인해, 신규의 구조 및 조성을 갖는 당화합물의 생산과 이의 용도 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

<16> 특히, 근래에 와서 세포벽의 바깥에 위치한 당화합물이 세포간 신호전달 매개체로서 중요한 역할을 한다는 것이 알려지면서 당화합물에 대한 관심이 더욱 고조되고 있다. 미생물에 의해 생산된 세포막 당화합물로서 상업화된 좋은 예들로는 잔탄검(xanthan gum), 풀루란(pullulan), 젤란검(gellan gum), 커들란(curdlan), 히아우론산(hyaluronic acid) 등이 있다.

<17> 한편, 느릅나무는 오래 전부터 중국과 한국에서 약으로 사용하여 왔으며, 민방에서는 코나무라고도 불리기도 하며 구황식물로 이용되기도 하였다. 느릅나무 뿌리껍질(유근피)은 한방이나 민방에서 건조된 형태로 사용되고 있으며, 그의 약성은 본초강목, 의학입문, 향약집성방, 동의보감등의 고전 의서들에서 언급되고 있다. 이러한 의서들에 따르면, 유근피는 부스럼과 종기에 탁월한 효능을 나타내며, 위하수, 위궤양, 십이지장 궤양에 효과가 있고, 또한 배가 사르르 아프고 소화가 안될 때, 소변이 잘 나오지 않을 때, 축농증과 중이염에, 종기, 종창과 끓은 상처에,

여성의 피부를 곱게 하는데, 자궁과 유방 질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

<18> 이러한 기술 배경하에, 본 발명자들은 유근피로부터 수용성 당화합물(단백다당체)를 추출하여, 그의 면역활성에 의한 항암효과를 검증한 바 있으며, 이 내용은 '느릅나무 유래의 단백다당체 및 그의 제조방법'이라는 제목으로 대한민국 특허출원 제 2000-636호로 출원 진행중에 있다.

<19> 그러나, 유근피에서 직접 추출한 수용성 단백다당체는 원료가 되는 느릅나무의 훼손이 불가피하고, 또한 지역이나 시간에 따른 추출물의 성분상에 차이가 있을 수 있어 품질관리면에서 동일한 제품의 생산이 어렵다는 문제점을 가지고 있었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<20> 이에, 본 발명자들은 상술한 문제점을 해결하고자 예의 연구 노력한 결과, 살아있는 유근피로부터 면역활성의 세포벽 당화합물을 생산하는 신규 미생물 *Enterobacter* sp.을 분리하였으며, 나아가 이 미생물을 발효시켜 세포벽 당화합물을 대량으로 생산하여 그의 면역활성에 의한 항암효과를 조사해 본 결과, 유근피에서 추출한 단백다당체와 유사한 생리활성이 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다. 결국, 미생물로부터 항암 면역활성의 세포벽 당화합물을 생산하는 경우, 자연보호에도 일조할 뿐만 아니라 시간이나 공간상에 전혀 제한을 받지 않으며, 배지조성 및 배양조건을 제어함으로써 품질관리면에서 동일한 제품을 생산할 수 있다.

<21> 따라서, 본 발명의 첫 번째 목적은 항암 면역활성의 세포벽 당화합물을 생산하는

신규의 미생물(*Enterobacter* sp.)을 제공하는 것이다.

- <22> 본 발명의 두 번째 목적은 전기 균주를 발효배지에서 배양하여 세포밖 당화합물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- <23> 본 발명의 세 번째 목적은 전기에서 생산된 세포밖 당화합물을 제공하는 것이다.
- <24> 본 발명의 네 번째 목적은 전기 세포밖 당화합물을 유효성분으로 포함하는 항암제, 면역증강제 또는 건강식품으로서의 용도를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <25> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.
- <26> 본 발명에서는 살아있는 느릅나무 뿌리껍질로부터 세포밖 당화합물을 생산하는 미생물을 분리하고 동정한 결과, *Enterobacter*속(屬)에 속하는 신규의 미생물인 것으로 검증되었다. 이후 전기 미생물을 MYGP(malt extract, yeast extract, glucose, bactopectone) 배지를 포함하는 여러 종류의 배양 배지에서, 온도 25~38℃, 회전속도 150~500rpm, pH 4.0~7.5, 통기량 0.1~1.5vvm의 조건으로 발효시켜 세포밖 당화합물을 생산하였으며, 그 생산된 당화합물을 발효액으로부터 분리, 정제한다. 필요한 경우, 세포밖 당화합물의 분리후 동결건조 공정을 추가시킬 수도 있다.
- <27> 이때, 배지 성분 중의 탄소원으로는 글루코스(glucose), 수크로스(sucrose), 프룩토스(fructose), 람노스(rhamnose), 갈락토오스(galactose), 아라비노오스(arabinose), 만니톨(mannitol), 락토스(lactose), 글루코네이트(gluconate), 자일로스(xylose) 또는

이들의 혼합물이 사용될 수 있다.

<28> 상기 세포밖 당화합물의 분리는 바람직하게는, 발효액을 원심분리하여 상등액을 수득하고, 아세톤, 에탄올, 메탄올 또는 프로판올 등의 유기용매를 1:1~1:5, 바람직하게는 1:2~1:3의 부피비로 첨가하여 세포밖 당화합물을 추출한 다음, 다시 이것을 증류수에 용해시키고 가압필터 또는 원심분리 등 기타 적절한 장치에 의해 잔여 세포를 분리하고, 한외여과 분자량이 4,000~14,000인 투석막(dialysis membrane)을 이용하여 잔당 및 분자량이 적은 물질을 제거함으로써 이루어진다. 투석막 처리후, 필요에 따라 가압필터 또는 원심분리를 추가로 수행할 수 있다.

<29> 상기에서 생산된 세포밖 당화합물은 100,000~1,000,000 범위의 분자량을 가지며, 총 당 함량 40 내지 75%, 총 산성당 함량 5 내지 15%, 총 단백질 함량 10 내지 25%로 구성되어 있다. 그리고, 다당류를 이루는 단당류의 종류와 함량은 10~30%의 글루코스(glucose), 1% 이하의 프룩토스(fructose), 10~15%의 갈락토스(galactose), 8~12%의 푸코스(fucose), 40~70%의 글루쿠론산(glucuronic acid)이다.

<30> 본 발명의 세포밖 당화합물에 포함된 단백질을 제거하기 위하여, 트립신(trypsin), 펩신(pepsin), 파파인(papain)등의 효소를 이용하는 생물학적 처리 또는 TCA(trichloroacetic acid) 등을 이용하는 화학적 처리를 가할 수 있다.

<31> 본 발명의 세포밖 당화합물의 농도에 따른 점성의 변화, pH에 따른 점성의 변화, 잔탄검(xanthan gum)과 비교한 세포밖 당화합물의 유변학적 성질을 통하여, 본 발명에서 생산하는 세포밖 당화합물이 상업적으로 이용되고 있는 일반 당화합물과 비슷한 슈도플라스틱(pseudoplastic) 유변학적 성질을 갖고 있음을 확인하였다.

<32> 한편, 본 발명에서는 상기 발효를 거쳐 최종 생산된 세포막 당화합물을 대상으로 하는 면역활성에 의한 항암효과에 대한 실험결과를 통해, 세포막 당화합물의 용도를 제시하고자 한다. 세포막 당화합물의 면역활성에 대한 효과는 생체외 면역활성 검정방법(면역세포 증식시험, 혼합림프액반응 측정, 면역세포 분열촉진 시험 등)과 생체내 면역활성 검정방법(폐혈성 쇼크모델에서의 치명적 독성확인, B16 흑색종 모델에 의한 항암효능 측정)으로 나누어 조사하였다.

<33> 그 결과, 세포막 당화합물은 면역세포의 증식과 그 세포의 분열촉진 및 혼합림프액의 강한 면역증강활성을 나타내었으며, 나아가 생체내 면역활성에 의한 항암효능에서는 0.3mg/kg 투여용량에서 흑색종에 걸린 마우스의 평균 생존율을 138.1% 상승시켰다. 이와 같은 면역활성에 의한 항암효과는, 3mg/kg에서 평균생존율을 139.2%로 상승시키는 것으로 보고되고 있는 유근피에서 추출한 수용성 단백다당체(참조: 대한민국 특허출원 제 2000-636호)의 경우와 비교하여 볼 때, 본 발명의 미생물 유래의 세포막 당화합물은 전기 수용성 단백다당체의 1/10 농도에서 유사한 정도의 항암효과를 나타내고 있음을 알 수 있었다.

<34> 따라서, 본 발명은 상기 세포막 당화합물을 유효성분으로 포함하는 항암제, 면역증강제 또는 건강식품을 제공한다. 이러한 특별한 용도외에도, 당화합물의 일반적인 용도로서 유화제, 안정제, 접합제, 응고제, 응결제, 윤활제, 필름형성제, 농후제, 현탁제 등 기타 공업적으로 주요한 중합체 매개원으로서도 사용될 수 있다.

<35> 본 발명의 세포막 당화합물을 유효성분으로 함유하는 항암제 또는 면역증강제는 경구적으로(복용 또는 흡입) 또는 비경구적으로(예를 들면, 정맥주사, 피하주사, 경피투여, 직장투약 등) 투약될 수 있으며, 전기 약제는 사용목적에 따라 정제, 캡슐제,

과립제, 산제, 좌약제, 연고제, 주사제, 유제, 현탁제, 시럽제등 여러 형태로 제조될 수 있다. 상기 여러 형태의 약제는 통상적으로 사용되고 있는 무독의 부형제, 결합제, 붕괴제(disintegrator), 활택제, 방부제, 산화방지제, 등장화제, 완충제, 피막제, 감미제, 용해제, 기제, 분산제, 안정화제, 착색제등의 첨가제를 사용하여 공지의 방법에 의해 제제화가 가능하다. 이어서 사용가능한 무독성 첨가제의 구체적인 예를 이하에 열거한다.

<36> 먼저, 부형제로서는, 전분 및 그의 유도체(덱스트린, 카르복시메틸스타치 등), 셀룰로오스 및 그의 유도체(메틸셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스등), 당류(유당, 설탕, 포도당등), 규산 및 규산염류(천연 규산알루미늄, 규산마그네 등), 탄산염(탄산칼슘, 탄산마그네슘, 탄산수소나트륨등), 수산화알루미늄, 마그네슘, 합성 히드로탈사이트(hydrotalcite), 폴리옥시에틸렌 유도체, 글리세린 모노스테아린산, 솔비탄 모노올레산등이 있다.

<37> 결합제로서는, 전분 및 그의 유도체(알파-전분, 덱스트린등), 셀룰로오스 및 그의 유도체(에틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 등), 아라비아고무, 트라가칸드 고무, 젤라틴, 당류(포도당, 설탕등), 에탄올, 폴리비닐알콜등이 있다.

<38> 붕괴제로서는, 전분 및 그의 유도체(카르복시메틸스타치, 히드록시프로필메틸스타치등), 셀룰로오스 및 그의 유도체(카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 히드록시프로필메틸셀룰로오스등), 탄산염(탄산칼슘, 탄산수소칼슘등), 트라가칸드 고무, 젤라틴, 당등이 있다.

<39> 활택제로서는, 스테아르산, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 활석, 규산 및

규산염(경질무수규산, 천연 규산알루미늄등), 산화티탄, 인산수소칼슘, 건조 수산화알루미늄 겔등이 있다.

<40> 방부제로서는, ρ -히드록시벤조산염, 아황산염(아황산나트륨, 피로아황산나트륨(sodium pyrosulfites)등), 인산염(인산나트륨, 폴리인산칼슘, 폴리인산나트륨, 메타인산나트륨(sodium methaphosphate)등), 알코올(클로로부탄올, 벤질알콜등), 염화벤즈알코늄, 염화벤제토늄, 페놀, 크레졸, 염화크레졸, 디히드로아세트산, 디히드로아세트산나트륨, 글리세린 소르브산, 당등이 있다.

<41> 산화방지제로서는, 아황산염(아황산나트륨, 아황산수소나트륨등), 롱가리트(rongalite), 에리토르브산(erythorbic acid), L-아스코르브산, 시스테인, 티오글리세롤, 부틸히드록시아니솔, 디부틸히드록시톨루엔, 프로필갈산(propylgallic acid), 아스코르빈산팔미테이트(ascorbylpalmitate), dl- α -토코페롤등이 있다.

<42> 등장화제로서는, 염화나트륨, 질산나트륨, 질산칼륨, 텍스트린, 글리세린, 포도당등이 있다.

<43> 완충제로서는, 탄산나트륨, 염산, 붕산, 인산염(인산수소나트륨 등)등이 있다.

<44> 피막제로서는, 셀룰로오스 유도체(히드록시프로필셀룰로오스, 셀룰로오스아세테이트프탈레이트, 히드록시프로필메틸셀룰로오스프탈레이트등), 셸락(shellac), 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐피리딘(폴리-2-비닐피리딘, 폴리-2-비닐-5-에틸피리딘 등), 폴리비닐아세틸 디에틸아미노아세테이트, 폴리비닐알코올 프탈레이트, 메타크릴레이트(methacrylate), 메타크릴레이트 공중합체등이 있다.

<45> 감미제로서는, 당(포도당, 유당, 설탕등), 사카린 나트륨, 당알코올등이 있다.

- <46> 용해제로서는, 에틸렌디아민, 니코틴아미드, 사카린나트륨, 구연산, 구연산염, 벤조산나트륨, 비누류, 폴리비닐피롤리돈, 폴리솔베이트, 솔비탄, 지방산 에스테르, 글리세린, 프로필렌글리콜, 벤질알코올등이 있다.
- <47> 기재로는, 지방(라아드등), 식물성기름, 동물성기름, 라놀린산(lanolin acid), 광유(petrolatum), 파라핀, 왁스, 수지, 벤토나이트, 글리세린, 글리콜유, 고급알코올(스테아릴알코올, 세탄올(cetanol)등)등이 있다.
- <48> 분산제로는, 아라비아 고무, 트라가칸트 고무, 셀룰로오스 유도체(메틸셀룰로오스등), 스테아르산 폴리에스테르, 솔비탄 세스퀴올레산염(sorbitan sesquioleate), 모노스테아르산알루미늄, 알긴산나트륨, 폴리솔베이트, 솔비탄 지방산 에스테르등이 있다.
- <49> 안정화제로서는, 아황산염(아황산수소나트륨등), 질소, 이산화탄소등이 있다.
- <50> 전기 약제의 제조에 있어서, 본 발명의 세포밖 당화합물은 각각의 제형에 따라 다르나, 일반적으로 0.01 내지 100 중량%의 농도로 포함되는 것이 바람직하다.
- <51> 본 발명의 항암제 또는 면역증강제의 투여량은 치료의 대상이 되는 인간등 온혈동물의 종류, 질환의 경중 및 의사의 판단등에 따라 광범위하게 다를 수 있으나, 일반적으로 경구투여의 경우에는 유효성분(세포밖 당화합물 또는 그의 염)을 기준으로 60kg 체중의 성인 1인당 하루에 0.01 내지 30mg/kg의 범위내에서 정하며, 비경구투여의 경우에는 0.01 내지 10mg/kg의 범위내에서 정하도록 한다. 상술한 일일 투여량은 한 번에 또는 나누어서 사용될 수 있으며, 질환의 정도 및 의사의 판단에 따라 임의로 변화될 수 있다.

<52> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게서 자명할 것이다.

<53> 실시예 1: 느릅나무 뿌리껍질로부터 세포막 당화합물을 생산하는 신규 미생물의 분리 및 동정

<54> 대한민국 부산광역시 김해군처 야산, 완도 수목원 또는 청산도에 서식하는 느릅나무의 뿌리를 채취하여 뿌리에 있는 흙을 털어낸 후 껍질을 벗겨서 잘게 절단한 다음, 증류수를 붓고 믹서기로 충분히 분쇄하였다. 이 과정에서 뿌리껍질에 있는 수용성 당화합물이 추출되면서 끈끈해지게 되는데, 이 끈끈한 액을 MYGP(malt extract 3 g/L, yeast extract 3 g/L, glucose 10 g/L, bactopectone 5 g/L) 고체한천배지에 백금니로 도말(streaking)하였다.

<55> 이후 30℃ 배양기에서 이틀정도 배양해가면서 고체 한천배지상의 다양한 콜로니(colony)들 중에서 세포막 당화합물을 생산하는 콜로니들을 분리하였다. 이어, 30℃, 200rpm 조건의 MYGP액체배지(100mL)에서 생산여부를 다시 확인하여, 최종적으로 가장 높은 생산성을 나타내는 균주를 분리하고 동정하였다. 이때, 균주의 동정은 국제기탁기관인 생명공학연구소 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures:KCTC)에서 균체 지방산 분석(MIDI), API 20E 검정, BIOLOG 검정, 16S rRNA 서열분석 등의 시험을 통하여

수행되었다. 도 1은 살아있는 느릅나무 뿌리껍질로부터 세포벽 당화합물을 생산하는 미생물의 분리과정을 나타내는 개략도이다.

<56> 상기 균주의 동정 결과, 세포벽 당화합물을 생산하는 전기 미생물은 *Enterobacter* 속(屬)에 속하는 신규 미생물로 검증되었으며, 이 균주를 '*Enterobacter* sp. SSYL'로 명명하여 국제기탁기관인 생명공학연구소 유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures:KCTC)에 1999년 11월 3일자 기탁번호 KCTC 0687BP로 기탁하였다.

<57> 실시예 2: 신규 미생물(KCTC 0687BP)을 이용한 세포벽 당화합물의 생산

<58> 실시예 1에서 분리된 신규 미생물을 이용하여 발효에 의한 세포벽 당화합물을 제조하기 위하여, *Enterobacter* sp. SSYL 균주를 하기의 배지조성 및 배양조건에서 배양하였다.

<59> 즉, 배지조성은 2ℓ의 발효조(Model MDL 6C, Marubishi Co. Ltd, JAPAN)에 대하여 60g 탄소원, 6g 몰트 추출물(malt extract), 6g 효모 추출물(yeast extract), 10g 박토펩톤(bactopeptone)으로 구성되었다. 이때, 탄소원으로는 글루코스가 사용되었다. 배양조건은 30℃, 250rpm, 통기량 0.25~1.0vvm, 하루 정도의 배양시간으로 하였다.

<60> 배양 후, 초고속 원심분리기(Sorvall RC 26 Plus, Rotor SLA-1500, USA)를 이용하여 12,000rpm에서 20분 원심분리하여 배양액으로부터 세포를 분리하고, 상등액을 수득하였다. 이 상등액에 아세톤(유기용매)을 1:2(v/v)의 비율로 첨가하여, 상등액으로부터 세포벽 당화합물을 분리하였다. 분리된 세포벽 당화합물은 다시 증류수(1.5 ~ 2ℓ)에 용

해시킨 후 0.7~1.6 μ m 범위의 여과지를 가압필터기에 넣어 필터링하고, 여과된 액을 6,000~8,000MWC 크기의 투석막(dialysis membrane)에 넣고 하루정도 증류수에서 투석하였다. 그런 다음, 투석된 액을 동결건조시킴으로써 최종적으로 흰색 성상의 건조된 세포막 당화합물을 얻었다. 탄소원에 대한 최종 세포막 당화합물의 수율은 10% 내외였다.

<61> 상술한 신규 미생물의 발효에 의한 세포막 당화합물의 제조과정은 도 2에 개략적으로 나타내었다. 도 3은 탄소원이 글루코스인 경우의 회분식 발효 양상을 나타내는 그래프이다.

<62> 실시예 3: 세포막 당화합물의 화학적 분석

<63> 실시예 3-1: 세포막 당화합물의 분자량 측정

<64> 세포막 당화합물의 분자량을 측정하기 위하여, 겔여과 컬럼(Tosohaas TSK-Gel G-3000SW, 직경 7.5mm, 길이 600mm, Japan)을 사용하고, 20mM 인산이 포함된 0.2M 아세트산암모늄(pH 6.8) 용액을 이동상으로 하여, 1.0ml/min의 유속으로 HPLC 분석하였다. 겔여과 분자량 표지물질로는 아포페리틴(443kDa), β -아밀라아제 (200kDa), 알콜탈수소효소(150kDa), 알부민(66kDa), 탄산탈수소효소(29kDa), 시토크롬 C(12.4kDa), 덱스트란(2000kDa)등을 사용하였다. 겔여과 컬럼에 덱스트란을 통과시켜 공부피(이하, 'Vo'라 함)를 구하고, 각각의 표준물질(덱스트란을 제외한 겔여과 분자량 표지물질에 포함되어

있는 6종류의 물질들)을 통과시켜 용출부피(이하, 'Ve'라 함)를 구한 후, 분자량 대 V_e/V_0 에 의한 검량곡선을 작성하였다. 세포벽 당화합물의 V_e 를 측정하고 검량곡선으로부터 V_e/V_0 를 계산하여 세포벽 당화합물의 분자량을 구하였는 바, 100 내지 1,000kDa 범위의 분자량을 갖는 고분자 물질인 것으로 확인되었다.

<65> 실시예 3-2: 세포벽 당화합물의 총 당 함량 측정

<66> 세포벽 당화합물의 총 당 함량은 페놀-황산법으로 측정하였다. 즉, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 세포벽 당화합물을 증류수에 용해시킨 용액 0.2ml 에 5%(w/v) 페놀수용액 0.2ml 을 가하고 진탕하였다. 여기에 98% 황산 1.0ml 을 천천히 가하고 10분간 방치한 다음 진탕하였고, 다시 30분간 방치하여 485nm에서 세포벽 당화합물의 흡광도를 측정하였다. 이때, 표준용액으로 글루코스 용액(증류수에 글루코스를 5, 10, 50, 100, $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 용해시킨 용액)을 사용하여 표준 용량곡선을 작성하였는 바, 세포벽 당화합물의 당 함량은 $56.9 \pm 9.7\%$ 이었다. 참고로, 수크로스를 탄소원으로 이용한 경우에 있어서, 세포벽 당화합물의 당 함량은 $52.9 \pm 2.26\%$ 이었다.

<67> 실시예 3-3: 세포벽 당화합물에 포함된 당 구성성분 분석

<68> 세포벽 당화합물의 당 구성성분을 분석하기 위하여, 8mg의 세포벽 당화합물을 0.8ml 의 2M 염산용액으로 처리하고, 100°C 에서 2 내지 5시간 가수분해 반응시킨 후, 탄산바

를 반응액을 중화시키고 원심분리하여, 분리된 상층액을 HPLC의 시료로 사용하였다. 분리컬럼(Waters Carbohydrate, 직경 4.6mm, 길이 250mm, U.S.A.)을 사용하고, 75%(v/v) 아세토니트릴 수용액을 이동상으로 하여, 0.5ml/min의 유속으로 HPLC 분석하였다. 0.5M 수산화나트륨 용액의 컬럼 통과 후, 혼합기 (0.5ml/min)를 전기화학검출기(Waters 464, U.S.A.)에 결합시켜 검출하였다. 이때, 표준 용량곡선은 각 단당류 용액(증류수에 글루크론산(glucuronic acid), 람노스, 아라비노스, 글루코스, 갈락토스, 퓨코오스(fucose), 프룩토스(fructose) 등을 0.2 내지 10mg/ml의 농도로 용해시킨 용액)을 표준용액으로 사용하여 작성하였다.

<69> 그 결과, 세포막 당화합물의 당 구성성분은 글루쿠론산 46.7%, 퓨코오스 10.8%, 프룩토스 0.2%, 글루코스 29.9%, 갈락토스 11.0% 그리고 미지의 성분이 1.3% 정도임을 확인하였다. 문헌에 보고된 *Enterobacter*속의 미생물들이 생산하는 세포막 당화합물의 당 성분과 본 발명의 신규 미생물이 생산하는 세포막 당화합물의 당성분을 비교하여 하기 표 1에 나타내었다. 표 1에서 보듯이, 느릅나무 뿌리껍질로부터 분리된 신규 미생물에서 생산되는 세포막 당화합물의 당성분이 기존에 보고된 균주들과 상이함을 알 수 있었다.

<70> 표 1 : *Enterobacter*속 미생물들이 생산하는 세포막 당화합물의 당 성분의 비교

<71>

미생물	세포벽 당화합물의 당성분
<i>Enterobacter</i>	글루코스(glucose), 만노스(mannose), 람노스(rhamnose), 푸코스(fucose), 글루쿠론산(glucuronic acid), 갈락투론산(galacturonic acid)
<i>E. sakazakii</i>	글루코스(glucose), 갈락토스(galactose), 프룩토스(fructose), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아세트산(acetic acid)
<i>E. agglomerans</i>	글루코스(glucose), 갈락토스(galactose)
<i>E. cloacae</i>	글루코스(glucose), 갈락토스(galactose), 푸코스(fucose), 글루쿠론산(glucuronic acid), 피루브산(pyruvic acid), 아세트산(acetic acid)
<i>Enterobacter</i>	글루코스(glucose), 푸코스(fucose), 글루쿠론산(glucuronic acid)
본 발명의 미생물 <i>Enterobacter</i> <i>sp.</i>	글루코스(glucose), 프룩토스(fructose), 푸코스(fucose), 갈락토스(galactose), 글루쿠론산(glucuronic acid)

<72>

실시예 3-4: 세포벽 당화합물의 총 산성당 함량 측정

<73>

세포벽 당화합물의 산성당 함량은 우론산(uronic acid) 함량을 측정하는 카바졸법으로 구하였다. 즉, 세포벽 당화합물 50 μ g과 붕산나트륨/진한황산 시약(붕산나트륨 0.9g이 포함된 98% 황산 100ml) 1.5ml을 얼음 수욕상에서 처음에는 천천히 나중에는 세게 진탕한 후, 끓는 물에서 10분간 반응시켰다. 이어, 실온에서 냉각시키고, 냉각된 반응물에 카바졸/에탄올 시약(카바졸 10mg이 포함된 무수에탄올 10ml) 50 μ l를 가하고 진탕한 후, 다시 끓는 물에서 반응물을 15분간 가열하였다. 냉각시킨 후, 525nm에서 세포벽 당화합물의 흡광도를 측정하였다. 이때, 표준용액으로 글루크론산 용액(증류수에 글루크론산을 15, 30, 50 μ g/ml의 농도로 용해시킨 용액)을 사용하여 표준 용량곡선을 작성하였는 바, 세포벽 당화합물의 총 산성당 함량은 9.26 \pm 3.03%이었다. 참고로, 수크로스를 탄소원으로 이용한 경우에 있어서, 세포벽 당화합물의 총 산성당 함량은 11.8 \pm 0.85%이었다.

<74> 실시예 3-5: 세포밖 당화합물의 총 단백질 함량 측정

<75> 세포밖 당화합물의 단백질 함량을 측정하기 위하여 로우리법을 약간 개량하여 사용하였다. 즉, 0.85%(w/v) 소금물에 세포밖 당화합물을 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 용해시킨 용액 0.2ml에 2.2ml의 뷰렛용액(Biuret reagent)을 넣고 진탕하였다. 여기에 폴린-시오카투시약(Folin-ciocalteu's reagent) 0.1ml을 가하여 혼합물을 잘 섞은 후, 실온에서 30분간 반응시킨 다음, 725nm에서 세포밖 당화합물의 흡광도를 측정하였다. 이때, 표준용액으로 소혈청알부민 용액(0.85%(w/v) 소금물에 소혈청알부민을 250, 500, 750, $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 용해시킨 용액)을 사용하여 표준 용량곡선을 작성하였는 바, 세포밖 당화합물의 단백질 함량은 19.9 내지 0.92%였다. 참고로, 수크로스를 탄소원으로 이용한 경우에 있어서, 세포밖 당화합물의 단백질함량은 $16.9 \pm 2.05\%$ 이었다.

<76> 상기 결과를 바탕으로 세포밖 당화합물의 성분을 총 당함량, 총 산성당함량, 총 단백질함량으로 나타내면, 도 4와 같다.

<77> 실시예 3-6: 세포밖 당화합물의 농도, pH에 따른 점성 변화 및 잔탄검(Xanthan gum)과 비교한 유변학적 성질

<78> 하케 점도계(Hakke viscometer)를 이용하여, 수크로스(sucrose)를 탄소원으로 했을

때 생산된 세포막 당화합물의 농도별 점성을 측정하였다(참조: 표 2). 이때, 스펀들은 S51을 사용하였으며, 측정온도는 25℃였다.

<79> 표 2: 세포막 당화합물의 농도에 따른 점성 변화

<80>

세포막 당화합물의 농도(mg/ml)	점도(cP)
1.1	4.4
9.5	260
15.4	9200

<81> 또한, pH에 따른 점성의 변화를 알아보기 위해, 0.5%(w/v) 세포막 당화합물 용액을 만들어 산, 염기를 첨가하고 pH 변화에 따른 점성의 변화를 관찰하였다(참조: 표 3). 0.5% 세포막 당화합물 용액의 초기 pH는 4.10으로 산성을 나타내었다.

<82> 표 3: pH에 따른 세포막 당화합물의 점성 변화

<83>

pH	점도(cP)
2.68	76.5
4.10	79.6
7.52	63.8
11.5	50.3

<84> 상기 표 3에서 보듯이, 점성은 pH 4정도에서 최고치를 나타내었으며, pH가 올라감에 따라 감소하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Enterobacter속 균주에서 생산된 세포막 당화합물의 경우 pH가 높아짐에 따라 점성이 차츰 증가하다가 pH 12정도에서 가수분해에 의해 급격하게 떨어지는 경향을 보여주는 종래의 보고(참조: J. of Ferment

and Bioeng., 84(2):13-18, 1997)와는 크게 상이함을 확인하였다.

<85> 한편, 세포박 당화합물의 유변학적 성질을 알아보기 위해, 1% 세포박 당화합물 용액과 1% 잔탄검(Xanthan Gum) 용액의 전단속도(shear rate)의 변화에 따른 점성변화 및 전단응력(shear stress)의 변화를 조사하였다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

<86> 도 5에서 보듯이, 세포박 당화합물은 상용화되고 있는 잔탄검과 비슷한 슈도플라스틱(pseudoplastic) 유변학적 성질을 보여 주고 있으며, 정상 점도(steady viscosity) 측면에서는 잔탄검과 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

<87> 실시예 4: 세포박 당화합물의 생체외 면역활성 검정

<88> 다당류의 항암활성은 암세포에 대한 직접적인 세포치사에 기인하는 것이 아니라, 면역활성에 의한 간접적인 치료에 의한 것이다. 상기 실시예 2에서 생산된 세포박 당화합물의 면역증강활성을 측정하기 위하여, 다음 세 가지의 생체외 면역활성을 검정하였다.

<89> 실시예 4-1: 면역세포 증식시험(Immune cell proliferation assay)

<90> 특정병원체부재(Specific Pathogen Free, SPF) Balb/C 마우스로부터 비장을 취하여 면역세포를 분리하였고, 면역세포의 최종 농도가 2×10^6 세포/ml, 세포박 당화합물(EPS)의 최종 농도가 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 200 µg/ml이 되도록 96-웰 플레이트에 세포박 당

화합물 $10\mu\text{l}$ 와 세포액 $90\mu\text{l}$ 를 처리하였다. 면역세포의 증식 정도를 알아보기 위하여, 세포밖 당화합물을 첨가하고 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 조건의 배양기에서 3일간 배양한 후, 배양액에 MTS 용액 $20\mu\text{l}$ 를 처리하고, 4시간 내에 490nm 에서의 흡광도를 측정하였다(참조: 도 6). 이때, 양성대조군으로는 리포폴리사카라이드 (LPS)를 동일한 농도 범위로 처리하여 사용하였다.

<91> 아울러, 현미경(200배율)으로도 면역세포의 증식정도를 확인하였는데, 도 7a는 대조군으로서 세포밖 당화합물의 첨가 농도가 $0\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 경우의 현미경 사진이고, 도 7b는 세포밖 당화합물의 첨가 농도가 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 경우의 현미경 사진이다. 도 7a 및 7b에서 보듯이, 면역세포의 현저한 증식을 확인할 수 있었다.

<92> 실시예 4-2: 혼합림프액 반응(Mixed Lymphocyte Reaction, MLR)

<93> 특정병원체부재의 B6C3F1(H-2K) 마우스와 BDF1(H-2d) 마우스의 비장세포 (5×10^6 세포/ ml)를 이용하여 혼합림프액 반응을 유도하였다. 본 발명의 세포밖 당화합물의 최종 농도가 1, 10, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 첨가하고, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 조건의 배양기에서 3일간 배양한 다음, ^3H -티미딘(thymidine)의 흡수정도를 계수하였다(참조: 도 8). 도 8에서 보듯이, 용매(PBS) 대조군에 비하여 세포밖 당화합물(EPS)을 처리한 경우, 혼합림프액의 강한 증강활성이 나타남을 확인할 수 있었다.

<94> 실시예 4-3: 면역세포 분열촉진(direct mitogenicity) 시험

<95> BDF1 마우스의 비장세포(1×10^6 세포/ml)를 96-웰 플레이트에 웰당 $200 \mu\text{l}$ 씩 가하고, 세포밖 당화합물의 최종 농도가 1, 10, $100 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 첨가한 후, 37°C , 5% CO_2 조건의 배양기에서 3일간 배양하고 ^3H -티미딘(thymidine)의 흡수정도를 계수하였다(참조: 도 9). 도 9에서 보듯이, 세포밖 당화합물의 농도가 증가함에 따라 면역세포의 분열속도가 빨라짐을 알 수 있는 바, 이는 세포밖 당화합물이 면역세포의 분열을 자극하는 효과(mitogenic effect)를 가진다는 것을 나타낸다.

<96> 실시예 5: 패혈성 쇼크 모델에서의 급성독성 확인

<97> 세포밖 당화합물의 독성 정도를 알아보기 위하여, 패혈성 쇼크 유발정도를 검증 비교하였다. 실험동물은 생명공학연구소(대전광역시 유성구 어은동 52번지 소재)에서 유지 관리되고 있는 특정병원체부재의 6주령 암컷 ICR마우스를 사용하였고, 세포밖 당화합물의 농도는 1, 3, 10, 30, 100mg/kg 마우스가 되도록 처리하였다. 대조물질로는 리포폴리사카라이드(LPS)를 3mg/마우스 (150mg/kg)의 용량으로 멸균 증류수에 희석하여 사용하였고, 실험 0일째에 세포밖 당화합물 및 LPS를 $0.2 \text{ml}/20 \text{g}$ 씩 복강 주사하였다. 결과는 6일째까지 하루에 두 번 사망 여부를 관찰한 후, 살아있는 마우스의 수를 조사하였다. 세포밖 당화합물의 경우 10mg/kg 이상의 농도에서 패혈성 쇼크(septic shock)와 유사한 독성 증상이 나타났지만, 그 이하의 농도에서는 독성이 나타나지 않았다(참조: 도 10). 이 결과로부터 세포밖 당화합물의 처리 농도를 3mg/kg 이하로 하여 세포내 면역증강에

의한 항암효과를 관찰하였다. 즉, 처리농도는 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3mg/kg로 하였다.

<98> 실시예 6: B16 흑색종 모델을 이용한 항암 효능 측정

<99> 세포밖 당화합물의 면역활성에 의한 항암효능을 검증하기 위하여, B16 흑색종 이식 마우스를 이용하여 실험하였다. 실험동물은 대한실험동물센터(주)로부터 공급받아 유지 관리되고 있는 특정병원체부재 BDF1 마우스(암컷, 18~22g)를 사용하였으며, 세포밖 당화합물은 멸균증류수에 희석하여 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3mg/kg의 농도로 조제하였다. 용매 대조군은 멸균증류수를 사용하였고, 양성 대조군으로는 아드리아마이신 (adriamycin, ADR) 1mg/kg을 사용하였다.

<100> 먼저, 그룹당 마우스를 10마리로 나누고, 실험 0일째에 B16 흑색종 세포(1×10^5 세포/동물)를 복강으로 마우스당 0.2ml을 이식하고, 4시간 경과 후 전기 조제된 세포밖 당화합물 및 용매를 복강주사하였다. 투여 횟수는 15일째까지 총 16회 투여하였고, 일일 투여량은 0.2ml/20g 체중이었다. 그 결과, 세포밖 당화합물은 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3mg/kg의 농도에서 각각 118.5%, 122.2%, 138.1%, 125%, 112.5%의 유의성 있는 항암효과를 보였으며, 0.3mg/kg 군에서 가장 강한 항암효과(약 140% 생존연장효과)를 나타내었다(참조: 도 11a, 11b). 이때 양성 대조물질인 아드리아마이신은 177.2% 이상의 높은 생존연장효과를 나타내었다.

<101> 아울러, 약물에 의한 독성 정도를 알아보기 위하여, 투여 당일부터 2일 간격으로 체중의 변화를 측정하였으며, 또한 하루에 두 번 사망 여부를 관찰하여 살아있는 마우스

의 수를 조사하였다. 그 결과, 세포밖 당화합물의 처리 후 14일째까지 특별한 체중의 감소는 관찰되지 않았다(참조: 도 12a, 12b). 그리고, 용매 대조군은 15일째에 사망 동물이 관찰되기 시작하였으며, 양성대조군을 제외한 전 처리군에서 34일째를 전후로 하여 모든 동물이 사망하였다.

【발명의 효과】

<102> 이 상에서 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 느릅나무로부터 분리된 신규의 미생물 및 그를 이용한 항암 면역활성의 세포밖 당화합물의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 세포밖 당화합물은 40 내지 75%의 총 당, 5 내지 15%의 총 산성당, 10 내지 25%의 총 단백질로 구성되어 있는 분자량 100,000~1,000,000의 물질로서, 생체외 또는 생체내 면역활성 검정을 통하여, 종양, 염증, 수종, 소화기계 암, 혈액암, 림프계 암, 전이성 암 및 간암등에 탁월한 항암 면역활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 세포밖 당화합물은 항암제로서 암 치료에 유효성분으로 사용될 수 있을 것이며, 면역증강제로서 면역저하로 인한 질병 즉, 임상면역학상의 난치성 질환, 암, 당뇨병, 남성불임증, 후천성 면역 결핍증(AIDS), 병원성 바이러스성 질환 및 기회감염으로 인한 질환 치료에 유효성분으로 사용될 수 있을 것이다. 또한, 본 발명의 세포밖 당화합물을 유효성분으로 포함하는 건강식품으로서도 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

【특허 청구범위】**【청구항 1】**

살아있는 느릅나무(*Chinese elm, Ulmus sp.*) 뿌리껍질로부터 분리되었으며, 항암 면역활성의 세포밖 당화합물을 생산하는 *Enterobacter*속(屬) 미생물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

Enterobacter 속(屬) 미생물은 기탁번호 KCTC 0687BP로 기탁된 균주인

을 특징으로 하는

미생물.

【청구항 3】

*Enterobacter*속(屬)의 미생물(KCTC 0687BP)을 배양 배지에서 발효시켜 항암 면역활성의 세포밖 당화합물을 생산하고, 그 생산된 당화합물을 발효액으로부터 분리하는 공정을 포함하는 항암 면역활성의 세포밖 당화합물을 제조하는 방법.

【청구항 4】

제 3항에 있어서,

배양배지 성분중의 탄소원은 글루코스(*glucose*), 수크로스(*sucrose*),

프룩토스(*fructose*), 람노스(*rhamnose*), 갈락토오스(*galactose*).

아라비노오스(arabinose), 만니톨(mannitol), 락토스(lactose),

글루코네이트(gluconate) 및 자일로스(xylose)로 구성된 그룹으로부터

선택되는 1종 이상의 물질인 것을 특징으로 하는

항암 면역활성의 세포막 당화합물을 제조하는 방법.

【청구항 5】

제 3항에 있어서,

발효는 배양온도 25~38℃, 회전속도 150~500rpm, pH 4.0~7.5, 통기량

0.1~1.5vvm 에서 진행되는 것을 특징으로 하는

항암 면역활성의 세포막 당화합물을 제조하는 방법.

【청구항 6】

제 3항에 있어서,

세포막 당화합물의 분리는 발효액을 원심분리하여 상등액을 수득하고,

유기용매를 1:1~1:5의 부피비로 첨가하여 세포막 당화합물을 추출한

다음, 다시 이것을 증류수에 용해시켜 잔여 세포를 분리하고, 한외여

과 분자량이 4,000~14,000인 투석막(dialysis membrane)을 이용하여

잔당 및 분자량이 적은 물질을 분리한 후, 동결건조시키는 것을 특징

으로 하는

항암 면역활성의 세포막 당화합물을 제조하는 방법.

【청구항 7】

제 6항에 있어서,

유기용매는 아세톤, 에탄올, 메탄올 또는 프로판올인 것을 특징으로

하는

항암 면역활성의 세포막 당화합물을 제조하는 방법.

【청구항 8】

제 6항에 있어서,

잔여 세포의 분리는 가압필터 또는 원심분리에 의해 수행하고,

투석막 처리후, 필요에 따라 가압필터 또는 원심분리를 추가로 수행하

는 것을 특징으로 하는

항암 면역활성의 세포막 당화합물을 제조하는 방법.

【청구항 9】

제 3항에 있어서,

세포밖 당화합물을 발효액으로부터 분리하는 공정에는 효소를 이용하는

생물학적 처리 또는 화학물질을 이용하는 화학적 처리에 의한 단백질

제거공정을 포함하는 것을 특징으로 하는

항암 면역활성의 세포밖 당화합물을 제조하는 방법.

【청구항 10】

제 3항의 방법에 의하여 제조된 세포밖 당화합물.

【청구항 11】

제 10항에 있어서,

세포밖 당화합물은 40 내지 75%의 총 당(10~30%의

글루코스(glucose), 1% 이하의 프룩토스(fructose), 10~15%의

갈락토스(galactose), 8~12%의 푸코스(fucose), 40~70%의 글루쿠산

(glucuronic acid)으로 구성됨), 5 내지 15%의 총 산성당, 10 내지

25% 의 총 단백질로 구성되어 있으며, 분자량이 100,000~1,000,000인

것을 특징으로 하는

세포밖 당화합물.

【청구항 12】

제 10항의 세포밖 당화합물을 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제.

【청구항 13】

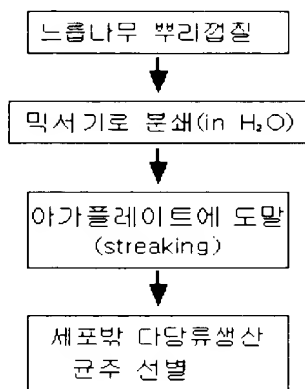
제 10항의 세포밖 당화합물을 유효성분으로 하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 면역증강제.

【청구항 14】

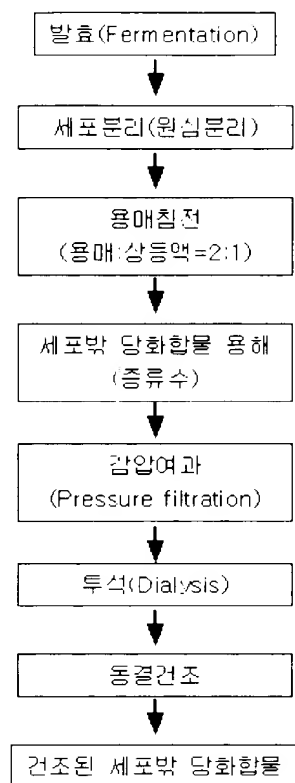
제 10항의 세포밖 당화합물을 포함하는 건강식품.

【도면】

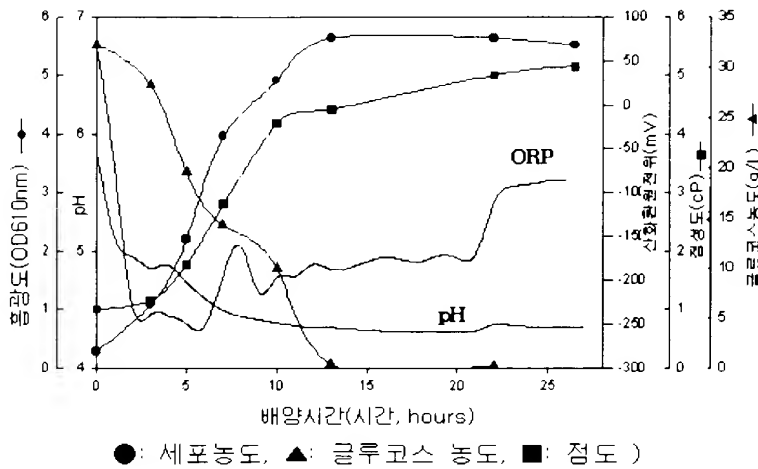
【도 1】



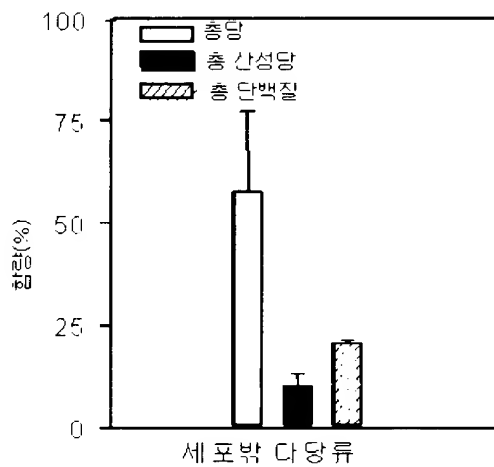
【도 2】



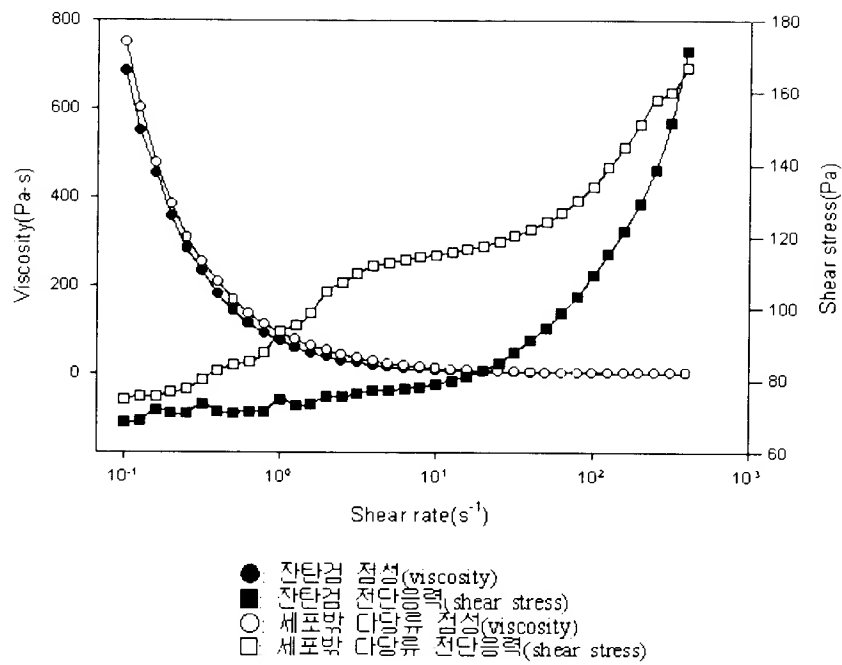
【도 3】



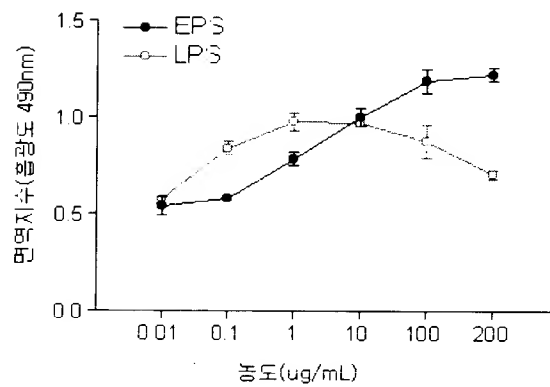
【도 4】



【도 5】

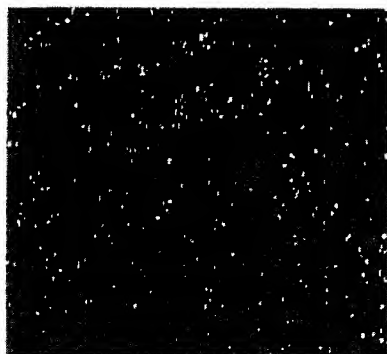


【도 6】

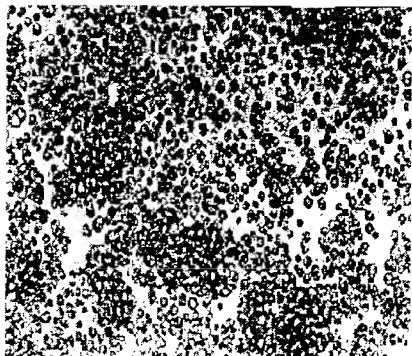


○: 기준물질(리포폴리사카라이드(LPS)) ●: 세포밖 당화합물(EP3)

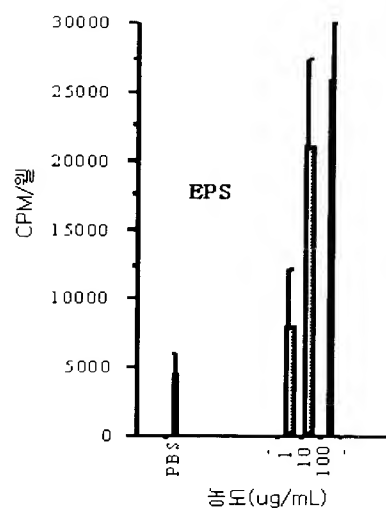
【図 7a】



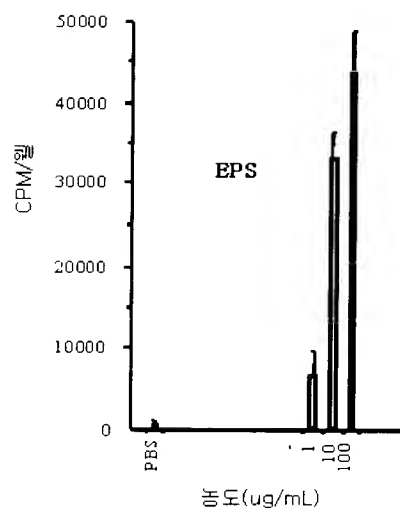
【図 7b】



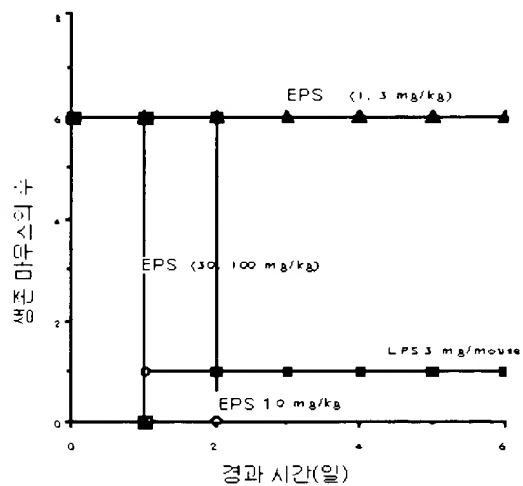
【도 8】



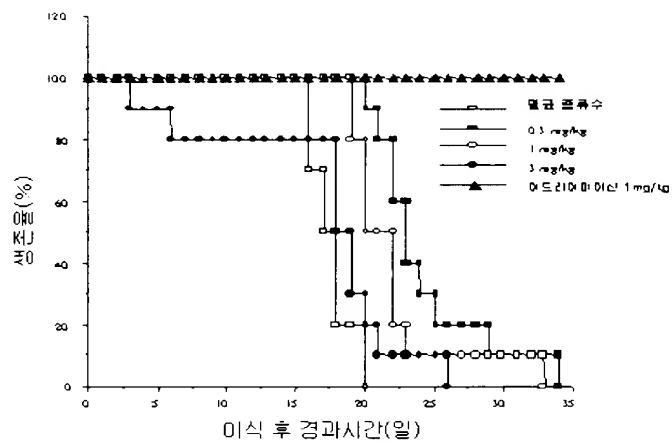
【도 9】



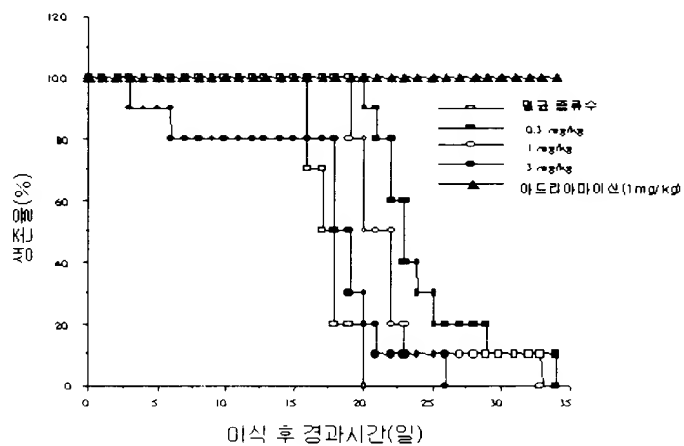
【도 10】



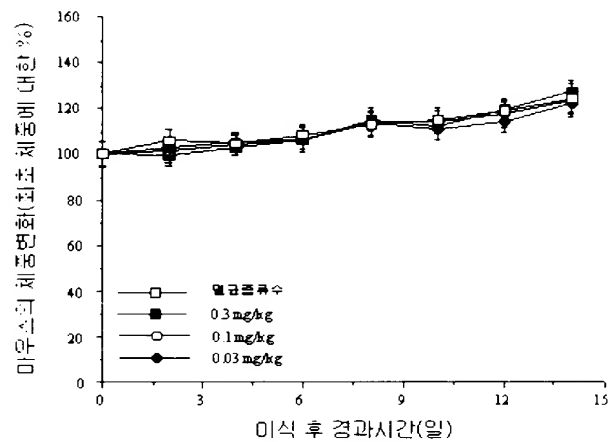
【도 11a】



【도 11b】



【도 12a】



【도 12b】

